Thesis Title Characterization of Acetylcholinesterase Inhibitors from *Stemona* spp. Root for Anti-Insect Property and Treatment of Neurological Disorders

Author Miss Sukanda Chaiyong

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr	Advisor
Asst. Prof. Dr. Chaiwat Jatisatienr	Co-advisor
Dr. Pitchaya Mungkornasawakul	Co-advisor

ABSTRACT

The root of two different *Stemona* species, *Stemona curtisii* Hook. F. and *Stemona aphylla* Craib. were investigated for insecticidal property, acetylcholinesterase inhibitory activity, antimicrobial activity and antioxidant activity. Phytochemical studies led to purification of bioactive compounds. Stemofuran L, stemofuran K, stemofuran J, stemofuran F and stemocurtisinol were isolated from the non-alkaoid crude extract of *S. curtisii* from Trang Province whereas dehydro-γ-tocopherol and stigmasterol were isolated from the petroleum spirit crude extract. Stemofuran S, oxystemokerrin, oxystemokerrin-*N*-oxide and oxyprotostemonine were isolated from the dichrolomethane crude extract of *S. curtisii* from Petchaboon Province. Meanwhile, stemofuran J, stigmasterol and dehydro-δ-tocopherol were also

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

isolated from the petroleum spirit crude extract of *S. aphylla* from Lampang Province. Morever, stemofuran L was isolated from the non-alkaoid crude extract, corresponding to that isolated from *S. curtisii* in Trang Province. The structure determination of each compound was carried out using NMR and MS spectroscopic analysis.

The effective insecticidal activities of different *Stemona* crude extracts were tested on *Spodoptera littoralis* (3 rd instar lavae) by the leaf disk choice method. From the results, the alkaloid crude extracts of *S. curtisii* and *S. aphylla* exhibited strong antifeedant activity at the concentration of 0.5% while repellent activity was presented only in the crude extract of *S. curtisii* at the higher concentration. In comparison, the commercial insecticide methomyl showed strong antifeedant inhibition at the concentration of 0.1%.

From a study of the acetylcholinesterase inhibitory activities of the isolated compounds from *Stemona* species, it was found that stemofuran S and oxystemokerrin-*N*-oxide were the most active compounds with a minimum inhibitory requirement of 100 ng whereas stemofuran K, stemocurtisinol and oxystemokerrin displayed weak activity with a minimum inhibitory requirement of 500-1000 ng.

The antimicrobial activities of the compounds from *Stemona* species were carried out by the broth dilution method. The results showed that the inhibitory effect of stemofuran J against *Cryptococcus neoformans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureu*s (MRSA) at the minimal inhibitory concentration (MIC) values of 7.8 and 15.6 μg/mL, respectively. Stigmasterol, dehydro-δ-tocopherol, dehydro-γ-tocopherol, stemofuran F, stemofuran K, stemofuran L, stemofuran S,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

oxystemokerrin, oxystemokerrin-*N*-oxide and oxyprotostemonine displayed weak inhibitory activity with MIC values ranging from 15.6 to 125 μg/mL.

For the microbicidal activities, all compounds were antifungicidal against *Cr. neoformans* at a concentration of 31.3 μg/mL. While dehydro-δ-tocopherol was the least activity against MRSA with a minimum bactericidal concentration (MBC) value of 500 μg/mL.

Efficiency of antioxidant activities from the crude extract of each *Stemona* species and some pure compounds were performed by the free radical 2, 2′-diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) assay. The results indicated that stemofuran S displayed the highest antioxidant capacity with an IC_{50} value of 30.19 μg/mL. Furthermore, the non-alkaloid crude extracts of *S. aphylla* and *S. curtisii* showed ability to scavenge DPPH radical with IC_{50} values of 113.80 and 148.70 μg/mL, respectively followed by the ethanolic crude extract and the alkaloid crude extract of *S. aphylla* (IC_{50} = 539.32 and 671.55 μg/mL). While an alkaloid crude extract and ethanolic crude extract of *S. curtisii* showed lower antioxidant capacity with IC_{50} values of 760.04 and 1,017.34 μg/mL, respectively. However, all of test samples were not active as the standard controls, trolox, BHA and α-tocopherol (Vitamin E).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การ หาลักษณะเฉพาะของสารยับยั้ง อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสจากราก หนอนตายหยากสำหรับสมบัติการต่อต้านแมลงและการรักษาความผิดปกติทางระบบประสาท

ผู้เขียน นางสาวสุกานดา ไชยยง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อารยา จาติเสถียร	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ชัยวัฒน์ จาติเสถียร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. พิชญา มังกรอัศวกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

คุณสมบัติในการต่อต้านแมลง การยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์และการต่อต้านอนุมูลอิสระถูกศึกษาจากรากหนอนตายหยาก 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Stemona curtisii* และ *Stemona aphylla* การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารประกอบ stemofuran L, stemofuran K, stemofuran J, stemofuran F และ stemocurtisinol แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้น non-alkaloid ของหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* จากจังหวัดตรัง ขณะที่ dehydro-γ-tocopherol และ stigmasterol แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้น petroleum spirit

สารประกอบ stemofuran S, oxystemokerrin, oxystemokerrin-*N*-oxide และ oxyprotostemonine แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้น dichrolomethane ของหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* จากจังหวัดเพชรบูรณ์

สารประกอบ stemofuran J, stigmasterol และ dehydro-δ-tocopherol แยกได้จากสารสกัดหยาบชั้น petroleum spirit ของหนอนตายหยากพันธุ์ *S. aphylla* จากจังหวัดลำปาง นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ stemofuran L ในสารสกัดหยาบชั้น non-alkaloid ของหนอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตายหยากพันธุ์ *S. aphylla* ซึ่งเหมือนกันกับสารที่แยกได้จากหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* จากจังหวัดตรัง การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ดำเนินตามวิธีการวิเคราะห์ทางสเปกโตสโคปี

ประสิทธิภาพในการต่อต้านแมลงจากสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ ของหนอนตายหยากได้รับการทดสอบต่อหนอนกระทู้ผักวัย 3 โดยวิธี leaf disk choice จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบชั้น alkaloid ของหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* และ *S. aphylla* มีคุณสมบัติเป็น strong antifeedant ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารได้แรงที่ระดับความเข้มข้นสาร 0.5% เมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงทางการค้า (methomyl) พบว่า methomyl จะมีคุณสมบัติเป็น strong antifeedant ได้ต้องมีระดับความเข้มข้นสารสูงขนาด 0.1 % นอกจากนี้หนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* ยังมีคุณสมบัติเป็น repellent ซึ่งออกฤทธิ์ในการไล่เมื่อมีระดับความเข้มข้นสารตั้งแต่ 5% ขึ้นไป

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสจากสารประกอบที่แยกได้จากหนอนตายหยากพบว่า สารประกอบ stemofuran S และ oxystemokerrin-*N*-oxide แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 100 นาโนกรัม ขณะที่สารประกอบ stemofuran K, stemocurtisinol และ oxystemokerrin มีฤทธิ์ในการยับยั้งอ่อนกว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 500-1,000 นาโนกรัม

การศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ดำเนินตามวิธี broth dilution จากผลการทดลองพบว่า สารประกอบ stemofuran J มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureu*s (MRSA) โดยมีค่า MIC ที่ 7.8 และ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนสารประกอบ stigmasterol, dehydro-δ-tocopherol, dehydro-γ-tocopherol, stemofuran F, stemofuran K, stemofuran L, stemofuran S, oxystemokerrin, oxystemokerrin-*N*-oxide และ oxyprotostemonine แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้น้อยโดยมีค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 15.6-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แต่เมื่อพิจารณาฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ พบว่าสารประกอบที่แยกได้ทั้งหมดไม่สามารถทำลายเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารมาตรฐานที่ใช้อยู่

การศึกษาประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ จากหนอนตายหยากและสารบริสุทธิ์บางตัวโดยวิธี free radical 2, 2′-diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH) (Yen *et al*., 1997) จากผลการทดลองพบว่า สารประกอบ stemofuran S แสดงฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ สารสกัดหยาบชั้น non-alkaloid จากหนอนตายหยากพันธุ์ *S. aphylla* และ *S. curtisii* ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 113.80 และ 148.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามลำดับ ตามด้วยสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์และสารสกัดหยาบชั้น alkaloid จากหนอนตายหยากพันธุ์ *S. aphylla* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 539.32 และ 671.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดหยาบชั้น alkaloid และสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์จากหนอนตายหยากพันธุ์ *S. curtisii* มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 760.04 และ 1017.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารที่ใช้ออกฤทธิ์ทั้งหมดดังกล่าวแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐานที่ใช้ซึ่งได้แก่ trolox, BHA and α-tocopherol (Vitamin E)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved